# 2011年度 生物工学賞 受賞



Research on systems bioengineering and the integrated metabolic regulation of a cell

Kazuyuki Shimizu (Faculty of Information Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology, Iizuka, Fukuoka, 820-8502) Seibutsu-kogaku 90: 2–19, 2012.

「生物工学」は生物を利用したさまざまな工学応用に関 する学問分野と思われるが、とりわけ、発酵 (fermentation) に関する研究は伝統的で歴史もある.一方, 1990年代 から、「代謝工学」(metabolic engineering) に関する研 究も盛んになってきており、システム生物工学の手法を 利用して,代謝制御解析 (MCA) に関する理論的アプ ローチや,代謝ネットワークの最適化,効果的な遺伝的 改変による効率的な発酵生産の戦略, さらには, バイオ インフォーマテックスに関して、細胞システムのモデリ ングや、コンピュータシミュレーションに関する研究が 精力的に行われてきている.また、21世紀に入って、 ミニマムゲノムプロジェクトが立ち上がり、細胞増殖能 の高い、さまざまな発酵生産能を持った、新規細胞の創 生に熱い期待が寄せられてきている. 最近では、米国の ベンター研究所のグループによる、マイコバクテリアの 人工合成が話題になり、合成生物学や人工生命に関する 研究が脚光を浴びてきているが、この場合は、いわゆる ゲノム工学が中心的役割を果たしている.

さて、効率的な物質生産を目的として、関連する代謝 経路を操作する代謝工学に関する研究は、システム生物 工学の手法も取り入れながら、それなりに成果を上げて きたと考えられる.しかし、一般に、代謝産物を効率的 に生産する目的で、それに関連した代謝経路遺伝子を操 作しても、なかなかうまくいかないこともよく経験して いるところである.この場合、代謝フラックス、すなわ ち、細胞内での物質変換がどのような代謝ネットワーク で行われているかを定量的に把握することは重要で、こ の点から,炭素同位体(<sup>13</sup>C)を用いた精密な代謝フラッ クス解析は重要である.代謝フラックス分布は,いわゆ るオミックス情報の最上位に位置し,細胞の代謝をシス テムとして理解する上では,大変重要な情報だと思われ るが,なぜそのような代謝フラックス分布になったのか, すなわち,代謝調節制御の仕組みはどうなっているのか を調べることも大変重要で,このためにはさらに,遺伝 子発現,タンパク質発現,代謝物濃度などの情報も統合 して代謝解析を行う必要がある(図1).

## 代謝フラックス解析

代謝量論式に基づいた代謝フラックス解析 図2に 示すような、細胞の中心代謝経路について、フラックス (流束)を求める方法について考えてみよう.ここで、



図1. 細胞の統合的理解のためのさまざまなレベルの情報

著者紹介 九州工業大学情報工学研究院(教授)(兼)慶応義塾大学先端生命科学研究所 E-mail: shimi@bio.kyutech.ac.jp



図2. 細胞の中心代謝経路

フラックスとは、単位細胞、単位時間当たりの代謝反応 速度(mmol/gDCW.h)を意味している.ある細胞の培 養実験を行って、培養データが得られると、基質比消費 速度や代謝物比生成速度が得られ、これらの比速度を ri,代謝量論係数行列をAとすると、物質収支から定常 状態では次式が成り立つ.

 $Ar = 0 \tag{1}$ 

ここで,rは比速度riを要素として持つベクトルである. いま,比速度ベクトルrを,測定できる比速度ベクトル rmと,細胞内の測定できない比速度ベクトルrcに分け, これに対応した量論係数行列を,それぞれAmおよびAc とすると,(1)式は次のように表わすことができる.

$$A_{m}r_{m}+A_{c}r_{c}=0$$
(2)

一般に、行列 $A_c$ は正方行列とは限らないので、(2)式の両辺に、左から $A_c$ <sup>T</sup>をかけて、いくつか操作を行うと、 r<sub>c</sub>は $r_m$ から量論係数行列を介して、次のように求められる.

$$\mathbf{r}_{c} = -(\mathbf{A}_{c}^{T}\mathbf{A}_{c})^{-1}\mathbf{A}_{m}\mathbf{r}_{m}$$
(3)

ここで、"<sup>T</sup>"は行列の転置を表わしている.実際には、 rmの測定誤差を考慮して、次の最尤推定式を用いる.

$$\mathbf{r}_{c} = -(\mathbf{A}_{c}^{\mathrm{T}} \Sigma \mathbf{A}_{c})^{-1} \mathbf{A}_{\mathrm{m}} \Sigma \mathbf{r}_{\mathrm{m}}$$

$$\tag{4}$$

ここで,Σは誤差分散共分散行列である<sup>1)</sup>.

さて、この式を用いて、原理的には細胞内の代謝フラッ クス分布を求めることができる.しかし、この方法では、 (1) 可逆反応での前向き、および後ろ向き反応のフラッ クス,(2) リサイクルを含む代謝経路のフラックス,(3) 分岐してまた合流するような代謝経路のフラックスなど は求められない. これらの場合は、代謝量論係数行列が 特異(singular)になって逆行列が求められないからで ある<sup>2)</sup>.この問題を克服するには、次に述べる同位体を 利用した代謝解析が必要になってくる.ただし、微好気 条件や嫌気条件で細胞を培養した場合は、代謝反応もほ ぼ一方向で、リサイクルも含まれないため、上記のアプ ローチでも、ある程度有効である.たとえば、嫌気条件 でのさまざまな大腸菌の1遺伝子欠損株の代謝解析<sup>3-5)</sup> や、調節遺伝子であるfnr遺伝子欠損株の代謝解析にも 有効であることがわかっている<sup>6</sup>. また、好気培養条件の 場合でも、一部の代謝経路をひとまとめにして (lumping)、 概略の代謝フラックスを求めることもできる<sup>7,8)</sup>.また, 定式化によっては、利用できる代謝量論式の数に比べて、 変数の数が多くなり、自由度の点から、解が求められな い場合があるが、その場合は、NADH/NAD<sup>+</sup>の収支を 導入して制約条件式を加えたり、エネルギー (ATP) 生 成や生合成を最大にする最適化問題を解くことによって、 フラックスを求めることもできる.また、最近では数百 から千を超える代謝反応を考慮した、いわゆるゲノムス ケールの代謝フラックス解析も盛んに行われている<sup>9</sup>.

炭素同位体を利用した代謝解析 さて、代謝量論式 に基づく代謝フラックス解析法 (FBA, flux balance analysis)は、上でも述べたように、一般的な好気培養条件 での解析には課題がある.少なくとも、ある程度の精度 が要求される場合は、適用が困難である、ここでは、よ り精密な代謝フラックスを求めるための、炭素同位体を 利用した代謝フラックス解析 (<sup>13</sup>C-metabolic flux analysis. <sup>13</sup>C-MFA)について説明する.いまたとえば、図3に示 されるような、炭素数が3つの場合の代謝物について考 えてみよう<sup>10)</sup>.この場合、それぞれの炭素が<sup>13</sup>C(黒丸) か<sup>12</sup>C(白丸)のいずれかと仮定すると、2<sup>3</sup>=8種類の同 位体(isotopomer)が存在し、情報量が飛躍的に増加す るので、これらの情報を有効に利用することができれば、 上で述べた(1)-(3)の課題を克服できるはずである. ただし、これらのすべての同位体を検出できるわけでは ないので、解析には注意が必要である.たとえば、NMR



図3. 同位体の種類とその測定



図4. NMRとマルチプレットスペクトルパターン(左図)と, GC-MSと検出情報の変化(右図).

(nuclear magnetic resonance, 核磁気共鳴)を用いた場 合, すべての原子の核が測定できるわけではなく, 核ス ピン量子数が0の核.たとえば<sup>12</sup>Cの核スピン量子数は 0なので測定できない。一方。<sup>13</sup>Cは核スピン量子数が 1/2なので観測でき、NMRでは隣接した原子核によっ て信号の分裂が生じるので、スピンースピン結合は、近 くの核どうしの構造的なつながりを表わす重要な情報を 与えてくれる.スピン結合の大きさ、すなわち、分裂し た信号の間隔はJ値(スピンースピン結合定数)と呼ばれ, J値の大きさは、エネルギー的に2つの核スピンが、ど れだけ強く結合しているかを示していると言ってよい. 一般に,代謝解析では2次元[<sup>13</sup>C,<sup>1</sup>H]COSY (correlation spectroscopy) NMR がよく用いられるが、この場合の横 軸は化学シフトを表わしており、ある代謝物の化学シフ トの位置で、縦軸にスキャンすると、図4の左下ような <sup>13</sup>Cの共鳴スペクトルパターンが得られる.いま,着目 している<sup>13</sup>Cの炭素原子の隣の原子が<sup>12</sup>Cの場合は一本 のピーク (singlet) が現れ、隣の原子が<sup>13</sup>Cの場合は、 ダブレット分裂による2本のピークが現れる.また、両 隣が<sup>13</sup>Cの場合は、二重ダブレットの4本のピークが現れ、 両隣との結合定数が同じ場合は、2本のピークが合わ さって、トータルで3本のピーク (triplet) が見られる. 実際には、同位体分布に応じて、図4の左下の図に示す ように、これらのピークパターンが合わさったマルチプ レットスペクトルパターンとして観察でき、野生株と欠 損株、あるいは異なる培養条件での同位体分布を比較す ることで、代謝フラックスの違いを解析したり11-13)、特 定の代謝の分岐点でのフラックス比を解析することがで きる 13,14).

一方, GC-MSやCE-MS, CE-TOF/MSを利用する場合は, 図4の右の図に示すように, 分子の重さの違いに

ついては識別できるが、どの位置の炭素原子が<sup>13</sup>Cなの かはわからない.このため、図3の例では、8個の情報 は重さの違いによるm<sub>0</sub>, m<sub>1</sub>, m<sub>2</sub>, m<sub>3</sub>の4個だけになり、 位置の情報も得られないので、実験計画に際しては、供 給炭素源に位置の情報を含んだ[1-<sup>13</sup>C]炭素源などを含 める必要がある.ただし、GC-MSを用いる場合は、誘 導体化を行うので、図4の右下に示すように、さらに追 加の情報を利用できる.

さて、炭素同位体を利用した代謝解析では、<sup>13</sup>Cで標 識された供給炭素原子が、細胞内で代謝された場合、代 謝経路ネットワークの異なる経路を通った場合に同位体 分布が異なることを利用している.たとえば、いま簡単 のために,図5aに示すように100%の[1-<sup>13</sup>C]グルコース を用いて細胞を培養したとしよう.この場合、グルコー スの一部が解糖 (EMP) 経路で代謝された場合は、[3-<sup>13</sup>C] GAPさらには[3-<sup>13</sup>C]PYRが生成されるのに対し、ペン トースリン酸(PP)経路を通った場合は、6PGDHの反 応で、グルコースの(標識された) 最初の炭素はCO2と して逃げてしまい、標識されていない代謝物が、非酸化 的PP経路を経て、解糖系のF6PやGAPに合流すること になる.もちろん、実際には非酸化的PP経路は可逆な ので,話はそう簡単ではない.なお, PP経路の役割は, R5PやE4P、S7Pなどアミノ酸や核酸などの前駆体や、 生合成のためのNADPHを生成することだと思われる が,前者の要求量はあまり多くないので,多くの場合は, NADPHを生成した後の代謝物のほとんどは非酸化的 PP経路を経て、解糖系に合流すると考えてよい、また、 図5bに示すように、エントナードウドロフ(ED)経路 を通った場合は[U-<sup>12</sup>C]GAPと[1-<sup>13</sup>C]PYRが生成され

4



図5. 100%の[1-<sup>13</sup>C]グルコースを用いて培養した時の代謝の推移(a), ED経路が活性化した場合(b), TCA回路での炭素原子の 推移(c).

るが、MSでは解糖経路を通った[3-<sup>13</sup>C]PYRとED経路 を通った[1-<sup>13</sup>C]PYRを区別できないことになる.この 場合は、PDHc(ピルビン酸脱水素酵素)の反応で、 PYRの最初の炭素がCO<sub>2</sub>として抜けるので、αケトグル タル酸(αKG)やグルタミン酸(Glu)の同位体を解析 すれば、どれくらいの割合で、解糖経路とED経路を通っ たかを、少なくとも原理的には解析できることになる.

さらに、図5cに示すように、ピルビン酸や酢酸を酸 素源として細胞を培養した場合は、OAAの両端の炭素 原子はICDHとαKGDHの反応でCO2として逃げてし まい、情報を失うことになるが、 グリオキシル酸経路を 通った場合は、これらの情報は保持される. また、コハ ク酸(SUC)は左右対称なので、1/2の確率で炭素の並 びが逆の分子が存在すると仮定する. さらに、OAAは TCA回路のリンゴ酸(MAL)から生成される以外に, PEPから補充反応経路のPpcによっても生成されるが. この場合、OAAの4番目の炭素原子はCO2の固定化に よってもたらされる. CO2の炭素原子も一定割合で標識 されていると思われるが、不確定要素が大きいので、一 般には、簡単に<sup>12</sup>Cとするか、変数として最適化を行っ て標識度を決める場合もある.なお,図5cに示すように, TCA回路は閉回路であり、1回目、2回目、3回目と TCA回路を回るに従って同位体分布は変化するはずで あるが、定常状態では一定値に落ち着くので、一般には 定常状態での値を用いる<sup>15,16)</sup>.

さて、炭素同位体を用いたフラックス解析では、定常 状態での物質収支と同位体収支を利用する.このために、 Zupkeら<sup>17)</sup>は、代謝物質Aのそれぞれの炭素原子が<sup>13</sup>C でどれくらい標識されているか示す標識度ベクトル (metabolite activation vector, MAV) を導入し、さらに 代謝反応ネットワークのそれぞれの反応について、たと えばA→Bの反応で、Aの何番目の炭素原子がこの反応 によってBの何番目の炭素原子になるかを規定した原子 写像行列 (atom mapping matrix, AMM) を提案している. この表記法で、同位体収支を表現できるが、これはあく までも仮想的な概念であるので、GC-MSやNMRを用い て同位体分布を測定することを考えると、実際の同位体 分布に対応した表記法が望ましい. すなわち, 図3に示 した例のように、炭素数が3つの場合は、実際には、8種 類の異なる同位体が存在し、それぞれの同位体がどれく らいの割合で存在しているか(同位体分布)を示す同位 体分布ベクトル (isotopomer distribution vector, IDV)<sup>18)</sup> が有効で、上で述べた AMM に対応した同位体写像行列 (isotopomer mapping matrix, IMM) を導入するのが有 効だと思われる<sup>17)</sup>. たとえば, A+B→Cという反応で, A. B, CのIDVをそれぞれ、IA, IB, Icとし、A>Cおよび B>CのIMMをIMM<sub>A>C</sub>, IMM<sub>B>C</sub>と表すと、次式が成 り立つ.

$$(IMM_{A>C} \cdot I_A) \otimes (IMM_{B>C} \cdot I_B) = I_C$$
(5)

ここで、⊗は、2つのベクトルの要素ごとの掛け算を 表している<sup>19</sup>.

次に、フラックス計算の手順について簡単に触れてお こう.まず、細胞内の代謝フラックスを、たとえば代謝 量論式に基づいた代謝フラックス解析で示した方法に よって求め、初期値として仮定する.いま、供給基質の 同位体分布は既知であるので、たとえば、グルコースが 炭素源の場合は、上で述べた方法でIMMによってグル コースのIMMからG6PのIDVを求める. この場合. G6Pの同位体収支では、一般に、Pgiの反応を可逆と考 えると、F6PのIDVが必要になってくるが、最初はわ からないので、たとえば100%が標識されていない 「U-<sup>12</sup>C」F6Pと仮定するなどして計算を進める. このよ うにして、順次代謝ネットワークのIDVを計算していき、 繰り返し収束計算を行うが、いくつかの代謝物の同位体 分布がNMRやGC-MSで測定できたとすると、計算で 求めたIDVから予測されるNMRのスペクトルパターン や質量同位体分布について、実験値と推定値の誤差の二 乗和を計算し、測定できるすべての代謝物について、次 の評価関数が最小になるまでフラックス値を修正する.

$$J(v) = \sum_{i=1}^{M} \left(\frac{W_i - E_i(v)}{\delta_i}\right)^2 + \sum_{j=1}^{N} \left(\frac{Y_j - v_k}{\delta_j}\right)^2$$
(6)

ここで、vはフラックスのベクトルを、WiはM個の 同位体測定データ、Eiは仮定したフラックスに対応する i番目の代謝物の同位体の推定値である.YはN個の測 定した比速度でvkはvのk番目の要素で、j番目の比速 度データYjに対応している.また、δiとδjは測定値の絶 対誤差で、測定誤差の大きい項は、その項のJに対する 寄与率、すなわち、重みを小さくすることを意味してい る<sup>19</sup>. 収束計算では、可逆反応の前向き反応と後ろ向き反応 のフラックスも考慮するので、いくつかのフラックスを 探索変数(free flux)として、残りは代謝量論式によっ て決める.この場合、複数次元空間での探索を行う必要 があるが、一般に多峰性なので、大域探索に遺伝的アル ゴリズム (GA)を用い、局所探索法と組み合わせて探 索する必要がある<sup>20)</sup>.

一般に、細胞内代謝物濃度はnmolのオーダーで、ご く微量であるので、NMRやGC-MSを用いて、直接同 位体分布を測定するのは困難である.そこで従来は、培 養で採取したサンプルを6N塩酸で加水分解し、その中 に豊富に存在するアミノ酸(proteinogenic amino acid) の同位体分布を測定していたが、この方法だと、原則と して連続培養にしか適用できない、最近では、CE-MS やCE-TOF/MSによって、nmolのオーダーの代謝物の 濃度が検出できるようになり、細胞の中間代謝物の同位 体分布も直接測定できるようになってきたので<sup>21)</sup>、擬定 常状態を仮定すれば、回分培養のように、代謝フラック スが時間とともに変化する場合についても求めることが できるようになってきた<sup>22)</sup>.

さて、代謝フラックス計算ではいくつかの補正を行う 必要がある.まず、自然界の物質に含まれる炭素原子の ほとんどは<sup>12</sup>Cであるが、約1.1%は<sup>13</sup>Cで汚染されてい るので、炭素以外の同位体も含めて、この影響を補正す る必要があるが、行列法を用いると効果的である<sup>23)</sup>.さ らに、連続培養などでは、図6に示すように、定常状態 が達成された後に同位体実験を開始するが、[U-<sup>13</sup>C]グ ルコースや[1-<sup>13</sup>C]グルコースなどは1グラム当たり約4 万円と高価なために、2-3滞留時間後にサンプルを採取す ることになる.この場合、サンプルを採取した時点では、 培養液が、完全には同位体を含む供給基質と置き換わっ



図6. 同位体実験とサンプルの同位体測定

# (a) Heterotrophic culture

### (b) Mixotrophic culture



図7. シアノバクテリアの代謝フラックス

ていないので,このための補正を行う必要がある<sup>19)</sup>.

また, 求めた代謝フラックス値が統計的にどの程度の 信頼性があるかを解析することも重要で, 一般に可逆反 応のフラックスの信頼度は低い傾向にあるが, これは, 可逆反応の前向き反応と後ろ向き反応のフラックスが多 少変化してもあまり同位体分布が変化しないことからき ている. さらに, 精度良い代謝フラックスを求めるには, どのように標識された供給炭素源を用いればよいかを考 えた実験計画について考察しておく必要がある<sup>24-26</sup>.

代謝フラックス解析の応用と統合的代謝解析へのアプ さて、次に代謝フラックス解析例について見 ローチ てみよう. 図7はグルコースを炭素源としてシアノバク テリアを培養した場合の代謝フラックス分布である.こ こで、図7aは暗くして培養した場合(heterotrophic culture) で, 図7bは光を照射して培養した場合 (mixotrophic culture)の結果である.シアノバクテリアはグリオキ シル酸経路を持っているものの、完全な形でのTCA回 路は持っていないので、細胞増殖速度は大腸菌などに比 べると著しく小さい. 図7aから、細胞を暗条件で培養 した場合は、酸化的PP経路のフラックス(90.2%)や Mez (me) のフラックス (68.5%) の値が大きいが, これは、生合成のための還元力(NADPH)の生成が重 要であることを示唆している. また, Ppcのフラックス (55.7%)も大きく、この経路でCO2を固定しているこ とが分かる.一方、図7bに示すように、光を照射した 場合は、PP 経路が抑制され、カルビンベンソン回路が 活性化し、この最初の反応のRubisCoでのCO2の固定は、 グルコース消費当たり、211.4%であり、PpcでのCO2 の固定も大きい(73.4%) ことがわかる. なお, < > の数字は,可逆反応を仮定した代謝経路の,前向き反応 と後ろ向き反応の共通部分の割合(可逆反応部分の割 合, exchange coefficient)を示しており,非酸化的PP経 路やカルビン回路の一部で大きくなっていることがわか る<sup>27,28)</sup>.一般に,この値が小さいほど非可逆反応を意味 しており,代謝の律速あるいは調節ポイントとなる可能 性があるが,2.1で述べたFBAの方法ではこのようなこ とは解析できない.

次に大腸菌野生株、およびG6PDHをコードしている zwf遺伝子を欠損させた株の代謝解析について見てみよ う. 図8は、これらの細胞を、希釈率0.2 h<sup>-1</sup>で、好気条 件で培養したときの<sup>13</sup>C-代謝フラックス分布である.こ の図では、上段に野生株のフラックス値を、下段にzwf 遺伝子欠損株のフラックス値を示している. これらを比 較してみると、zwf遺伝子欠損株では、野生株に比べて、 解糖系(EMP経路)のフラックス(の割合)が増加し、 非酸化的PP経路のフラックスの向きが逆になっており, さらに、酢酸生成経路やTCA回路のフラックスが大き くなっていることがわかる.またMezの経路が活性化 され、G6PDHや6PGDHで生成できなくなった NADPHを、この経路でバックアップしていることが示 唆される<sup>29)</sup>. なお、6PGDHをコードしている gnd 遺伝 子欠損株についても同様の結果が得られているが、この 場合は、ED経路が活性化されることがわかっている<sup>30)</sup>. また、pgi遺伝子欠損株やzwf遺伝子欠損株についてア ンモニア制限条件下では、著しく異なる代謝フラックス 結果が得られており、NADPHの生成やNADHとの相互



図8. zwf遺伝子欠損株大腸菌の代謝フラックス

変換(transhydrogenase, Udh, Pnt)が, 代謝フラックス の決定に大きな役割を果たしていることがわかる<sup>13,22)</sup>. また, pgi遺伝子欠損株では, NADPHが過剰に生成さ れるために, たとえばPHB合成遺伝子を組み込んで, この反応のAcAcCoAリダクターゼの反応に利用させた り<sup>31,32)</sup>, さまざまな異種タンパク質の生産とカップリン グさせることも考えられる.

次に、Pykをコードしている遺伝子*pykF*を欠損させ た代謝解析について見てみよう<sup>33,34</sup>. 大腸菌の*pyk*遺伝 子は、*pykFとpykA*の2つがあるが、一般に、前者が主で、 後者の貢献は小さいと考えられている. しかし、それぞ れの遺伝子は、別々に制御されているので、培養条件、 たとえばグリセロールを炭素源として培養した場合は cAMPが増加し、これによって*pykA*の遺伝子が重要な 役割を果たすことがわかっている. 図9は、*pykF*遺伝 子欠損株のフラックス(下段の数値)を野生株の値(上 段の値)と比較したものである. 代謝フラックスと同様 に、細胞内代謝物濃度や酵素活性などを測定することに よって、統合的な代謝解析を行うことも可能になる. こ の場合、*pykF*を欠損させると、Pykのフラックスは著



図9. pykF遺伝子欠損株大腸菌の代謝フラックス(上段の数 字が野生株,下段の数字がpykF欠損株)

しく低下し、PEPの濃度が増加してPpcが活性化し、 TCA回路のMDHを経て、Mezが活性化されることで、 pvkFの欠損によって低下したPYRが,別の迂回経路に よってバックアップされ、PDHのフラックスはあまり 変化がないことがわかる. また、PEPの蓄積によって解 糖経路のPvkの活性がアロステリックに阻害されて、 G6Pの濃度が増加し、このため、ptsGのmRNAが不安 定化し、グルコース消費速度が若干低下したことがわか る. また、G6Pの蓄積によって、酸化的PP経路のフラッ クスが増加し、Mezのフラックスの増加と合わせて、 pvk遺伝子欠損株では、NADPHが過剰に生成されるこ とが示唆される.実際、PEPの濃度と合わせてE4Pの 濃度も増加するので, 芳香族アミノ酸の生合成経路が活 性化されることも示唆される<sup>35)</sup>. このように、<sup>13</sup>C-代謝 フラックスに加えて、細胞内代謝物濃度や酵素活性を測 定すると、代謝フラックスの変化の背景がよく理解でき るようになる.

また,糖新生経路のpckA遺伝子を欠損させた場合<sup>36)</sup> や,この逆反応で,補充反応経路のppc遺伝子を欠損さ せた場合<sup>37)</sup>は,共にOAAの濃度が低下し,これが, aceBAKオペロンの発現を増加させ,ICDHがリン酸化 (aceK)されて活性が低下すると同時に,グリオキシル 酸経路が活性化され,このバイパス経路で,低下した



図10. 大腸菌野生株と24の1遺伝子欠損株のオミックスデータ

OAAを補う仕組みがあることもわかってきている.

次に, *lpdAやsucA*,*Cを*欠損させた場合や*poxBを*欠 損させた場合についても,同様の解析を行うと,グルタ ミン酸の過剰生成や,グリオキシル酸経路の活性化など 興味深い結果が得られている<sup>38,39</sup>.

さらに、解糖系(EMP経路)とPP経路の、致死遺伝 子を除く、ほぼすべての1遺伝子欠損株について、トラ ンスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム、それ にフラクソームのデータを求めると、図10の結果が得 られる.この図の横軸は、野生株と1遺伝子欠損株が24 株並んでおり、それぞれの株について、縦軸の下から遺 伝子発現、タンパク質発現、代謝物濃度がヒートマップ で示されており、この結果と代謝フラックスの結果から、 細胞がロバストにできていることが示唆される<sup>40</sup>.

さて、このように、さまざまなオミックス情報、ある いは異なるレベルの情報を集めて比較解析することは、 それなりに重要であると思われ、代謝フラックスを代謝 物濃度と酵素活性の点から解析すると効果的であること がわかる.しかし、酵素活性はタンパク質の発現量やリ ン酸化によって決まっており、これらはさらに遺伝子発 現や遺伝子レベルの制御によって決まってくるので、結 局,遺伝子の発現制御が,細胞の代謝システム全体を解 析する上で非常に重要だということがわかってくる<sup>41-46</sup>. とりわけ,培養環境や遺伝的変異が,どのようなメカニ ズムで細胞全体の代謝を調節制御しているかを解析する ことは,細胞をシステムとして理解する上で大変重要で ある.つぎに,この点について考えてみよう.

## 代謝調節制御機構

さて、大腸菌のような微生物では、遺伝子の発現制御 は主として転写レベルで行われていると考えられるが、 転写調節因子のほとんどはタンパク質であり、その多く はDNA配列を特異的に認識する、いわゆるDNA結合 タンパク質である.これらの転写調節タンパク質は培養 環境の変化に応じて発現し、DNA上の特定部位に結合 し、RNAポリメラーゼによる転写の促進、抑制をする. この場合、いくつかの転写活性因子が協調して、多くの 代謝関連遺伝子群を制御している(図11)<sup>44)</sup>.

このように、数多くの遺伝子の発現制御を担う調節タ ンパク質としては、糖代謝を調節するCra(catabolite repressor activator)やCrp(cAMP receptor prtein)、酸素 の濃度が低下した場合(微好気や嫌気培養条件)の ArcA/B(anoxic reduction control)やFnr(fumarate nitrate reduction)の他に、過剰酸素の場合のSoxR/SやOxyR など、また、酢酸や脂肪酸の合成と分解を調節するFadR (fatty acid degradation repressor)やIcIR(isocitrate lyase repressor)、ストレス応答に関するシグマ因子( $\sigma^{38}$ )を コードしている*rpoS*、あるいはタンパク質のRpoSなど があり、大腸菌細胞の場合、100近くの調節遺伝子が同 定されており (Regulon DB)、シグマ因子も7つ見つかっ ている.

**カタボライト制御** さまざまな生物あるいは細胞に とって、共通に炭素源はエネルギー生成や生合成の点か らもっとも重要な栄養源だと思われ、これらの取り込み や、その代謝は厳密に調節制御されていると考えられる. カタボライト制御に関する研究は1942年のMonodの研 究にまで遡ることができる<sup>47)</sup>. この場合、図12に示す ように、細胞の外膜にあるポリンタンパク質である、 OmpCやOmpF, LamBなどは、炭素源濃度だけでなく、 pHの変化 (acid shock) やNaCl濃度 (osmo shock) や 温度 (heat shock) などによっても発現が調節されてい る. また、外膜を経てペリプラズムに入ってきたさまざ まな物質は、内膜を通って、細胞質に入ってくることに なるが、内膜は厳密に調節制御されており、これらの仕 組みは細胞によってかなり異なっている<sup>48)</sup>.

図13には、大腸菌野生株(BW25113)の連続培養実験で、希釈率(比増殖速度)を0.2 h<sup>-1</sup>から0.7 h<sup>-1</sup>まで



図11. 培養環境の変化が転写活性因子やシグマ因子を経て代謝を制御するシステム



図12. PTSとカタボライト制御



図13. 連続培養での希釈率の変化に伴う調節遺伝子発現の変化と代謝関連遺伝子群の発現の変化



図14. 転写活性因子と代謝関連遺伝子群の調節制御

変化させた場合について,転写活性因子をコードしてい る遺伝子発現と代謝関連遺伝子群の発現を調べたもので ある<sup>49)</sup>.この図から,連続培養で希釈率を上げていくと, 細胞濃度が低下してグルコース濃度が高くなるが,この ために,*crp*遺伝子の発現(実際にはcAMP-Crp)が低 下し,*mlc*の遺伝子発現量も同じパターンで低下してい ることがわかる.また,同様に,*cra*の発現も低下し, 逆に*fadRやiclR*の発現が増加して,グリオキシル酸経 路の活性が低下し,糖新生経路関連の遺伝子発現が低下 し,PTSや解糖経路の遺伝子,*ptsG*,*ptsH*,*pfkA*などの 発現が増加していることがわかる.しかし,図14に示 すように,代謝関連遺伝子のそれぞれは,複数の転写活 性因子によって調節制御されており,たとえば,PTSの ptsGはcAMP-Crpからは正に制御されているが,Mlc からは負に制御されているので解析には注意が必要であ る<sup>49)</sup>.また,カタボライト制御とは直接関係のない,Fnr, ArcA/B, SoxR/S, Fur, RpoSなどといった転写活性因子 の影響も受けているので複雑である<sup>49)</sup>.

大腸菌のカタボライト制御には, PTS (phosphotransferase system)が重要な役割を果たしている. すなわち, PTSは解糖(EMP)経路のPEPのリン酸を、グルコー スのリン酸化に利用しているが、この場合、PEPのリン 酸は,まずptsIによってコードされたEI,次にptsHによっ てコードされたHPr. さらにcrrによってコードされた EIIA<sup>Gle</sup>と転移され、最後に、ptsGによってコードされ たEIIBC<sup>Glc</sup>を経て、グルコースに転移され、細胞質内 でG6Pとなったグルコースは細胞膜の外に出られない ようになる (図12). 一方, ptsG 遺伝子 欠損株などでは, グルコースの取り込みはMglACBやGalPのトランス ポーターによって行われ、Glkによって、ATPからリン 酸を受け取ってG6Pになるが、この場合は、PTSに比 べて効率が悪く、グルコース消費速度および細胞増殖速 度は著しく低下する.大腸菌の場合、炭素源の種類によっ て21のPTSが見つかっているが、EIは共通で、EIIが 炭素源特有のタンパク質になっている<sup>50)</sup>. さて, グルコー ス濃度が低下したり(400-500 µM以下). ptsG欠損株 などでは、リン酸化されたEIIA<sup>Glc</sup>(EIIA<sup>Glc</sup>-P)がEIIBC<sup>Glc</sup> にリン酸基を渡せなくなって、濃度が上昇し、これが、 Cvaを活性化して、ATPからcAMPを生成し、この濃 度が上昇する.次に, cAMPはCrpと複合体を形成して, このcAMP-Crpが転写活性因子として、グルコース以 外の輸送タンパク質の遺伝子発現を活性化させて、他の 炭素源が細胞質内に取り込まれることになる.このため、 野生株では、グルコースが存在する場合と、グルコース

が枯渇した後の,他の炭素源を消費する場合で増殖パ ターンが異なる,いわゆる2段階増殖(diauxic growth) が見られるが, *ptsG*欠損株などでは,グルコース存在 下でもcAMP-Crpの濃度が上昇するので,複数炭素源 の同時消費が可能になる.しかし,この場合は上でも述 べたように、グルコース消費速度は著しく低下する<sup>49</sup>.

ただし、上で述べたカタボライト制御の仕組みは、大 腸菌の生き残り戦略の結果であって、他の細胞との競争 の中で、エネルギー生成にもっとも効果的なグルコース だけを最初に取り込んで、細胞増殖し、他の細胞を圧倒 して生き残ってきた結果だとも考えられるが、酵母や Corynebacteria, Pseudomonas, Mycobacteriaなど, 微 生物によってこれらの制御機構は異なっている<sup>51)</sup>. なお. cAMP-Crpは炭素源の濃度レベルに応じて、発現調節を 行うが、細胞内の代謝(炭素原子)の流れはCraによっ て調節されており、Craは解糖経路のF1.6BPの濃度を 検知して, 糖分解経路のpfkA, pykF, zwf, edd, eda など の遺伝子群の発現を抑制し、糖新生経路のppsA、pckA、 icdA. aceBAKなどの遺伝子群の発現を活性させている. このため、cra遺伝子欠損株では、解糖経路が活性化さ れると思われるが、aceBAKやicdAの発現が抑制される ために、TCA回路の活性が抑制され、酢酸が過剰に生 成される結果となる<sup>52,53)</sup>.また、aceBAKのオペロンを 抑制しているIclRやFadRの遺伝子を欠損させると、グ



図15. 回分培養と培養の経過に伴うrpoS遺伝子発現の変化とその支配下にある遺伝子群の発現の変化

ルコース存在下でもグリオキシル酸経路が活性化し, TCA回路でのNADHの生成,さらにはATPの生成が低 下するため,細胞増殖速度は低下するが,TCA回路で 放出されるCO<sub>2</sub>の生成は少なくなるので,細胞収率は 向上する<sup>54</sup>.

また.図15に示すように、グルコースを炭素源とし て回分培養実験を行うと、グルコースの豊富な(指数) 増殖期(EP),グルコースが枯渇する細胞増殖後期(ES), グルコース以外の有機酸などを利用する停止期 (STA) と変化していくにつれて、細胞の代謝は大きく変化して いく.この場合、細胞増殖が進むにつれて、炭素源の枯 渇だけではなく、溶存酸素濃度やpHの変化など、さま ざまなストレスがかかってくるが、これらに対処する重 要な因子が、先にも述べた、ストレス応答のマスター調 節タンパク質である RpoS である. たとえば, 図15 に示 すように、RpoSによって正に制御されている*tktB*、 talA, acnA, sucA, fumC, acs, sodC, poxB, gadAなどは, rpoSの発現量に応じて変化し、培養が進むにつれて増 加していることがわかる.また、図15の右下の図から もわかるように、培養の経過に伴って、RpoSの支配下 にある*tktB*, *talA*, *acnA*, *fumC*の発現量は増加するが, *tktA*, *talB*, *acnB*, *fumA*などの発現量は低下しており、 それぞれのトータルの遺伝子発現量は、培養期間を通 してあまり変化していないことがわかる. 実際, 対応す る酵素活性を測定してみると、培養期間を通してほぼ一 定であることもわかってきている<sup>55,56)</sup>. この場合, rpoS



遺伝子を欠損させると、一般にはさまざまなストレスに 敏感になって、細胞増殖は不安定になってくる<sup>57)</sup>. なお、 rpoSの発現調節は、転写に加えて、図16に示すように、 分解もさまざまな調節を受けていることがわかってきて いる<sup>58)</sup>.

**窒素源制御** 炭素源の次に重要なのが,窒素源 (NH4<sup>+</sup>) に対する調節制御である.図17に示すように, TCA回路の $\alpha$ KGからGDHによってグルタミン酸(Glu) が生成されるが,この酵素をコードしている遺伝子は gdhAである.アンモニア濃度が高い場合は,この経路 が活性化され,NH3とNADPHを消費する.Gluは次に, glnAによってコードされたグルタミン合成酵素 (glutamine synthetase: GS) によって,グルタミン (Gln)を 生成するが,GSでは,NH3とATPが消費される.また,



図17. アンモニア代謝経路



図18. C/N比が遺伝子発現に及ぼす影響

アンモニア濃度が低下すると、GDHの活性が低下し、 gltBDによってコードされたグルタミン酸合成酵素 (glutamate synthase, GOGAT) が活性化され、この反 応によってGlnからGluが生成されるが、GOGATの反 応ではNADPHが消費される. アミノ酸全体のアミノ基 の9割近くが、グルタミン酸から、また残りの約1割程 度がグルタミンによって供給されるので、これらの経路 の調節制御は生合成にとって大変重要である.また、こ れらの代謝経路は、アスパラギン酸アミノトランスフェ ラーゼなどの反応とカップリングしているので、解析に は注意が必要である、さて、図18は、大腸菌野生株を、 アンモニア濃度(C/N比)を変えて、連続培養を行った ときの遺伝子発現結果である. この結果から、アンモニ ア濃度を低くしていく(C/N比を高くしていく)と、σ<sup>54</sup> をコードしているrpoNの遺伝子発現量が増加し(C/N 比が16.48のときはやや低下しているが). その発現量 の変化に応じて、glnBとglnK, さらに、glnALG,gltBD、 nacなどの遺伝子発現量が増加し、Nacの増加によって、 gdhAの発現が抑制されていることがわかる<sup>59)</sup>.この場 合の遺伝子発現制御機構を図19に示すが、アンモニア 濃度が低下する(C/N比が高くなる)と, glnLによって コードされたNR<sub>II</sub>(センサタンパク質)がこれを検知し. リン酸化されたNR<sub>II</sub> (NtrB) が, glnGによってコード されたNR<sub>I</sub>(NtrC)をリン酸化し、リン酸化されたNR<sub>I</sub> はnacやglnALGオペロンを正に制御し, glnAによって

コードされたGSを活性化させ,NacによってgdhAの 発現を抑制し,GDHの活性を低下させる.この発現制 御機構はさらに複雑で,GlnBとGlnKのウリジル化が, glnEによってコードされたATaseによって,GS-AMP をGSに変換する.また,図19の右の図に示すように, glnALGのプロモータ領域は,N源を検知して,リン酸 化されたNR<sub>1</sub>だけでなく,カタボライト制御に中心的役 割を果たす cAMP-Crpの結合領域もあり,C制御とN制 御は遺伝子制御レベルではつながっているということに なる.

アンモニア濃度を低下させると、GDHの活性が低下 し、GS-GOGAT回路が(ATPを消費して)活性化され ることがわかったが、この場合、呼吸鎖のシトクロムオ キシダーゼをコードしている*cyoAや cydB*などの遺伝子 の他、嫌気条件での調節タンパク質Fnrをコードしてい る*fnrや、*鉄イオンの取り込み制御に関係している*fur* の遺伝子発現量が非常に高くなることがわかった<sup>59)</sup>. そ こで次に、これらの遺伝子を欠損させた場合について解 析すると、図20に示すように、Fnrは*arcA*の発現を活 性化し、電子伝達物質であるキノールからキノンへの変 化を触媒しているCyo(やCyd)の遺伝子を制御してお り、酸素濃度の増加によってキノンの濃度が上昇すると、 これがArcBのリン酸化を阻害してArcAの脱リン酸化 を促進することもわかってきた<sup>60)</sup>. また、*arcA/Bを*欠 損させると、TCA回路が活性化されるが、NADHの過



図19. N-源代謝調節機構



図20. 呼吸鎖関連の遺伝子発現調節

剰生成に伴って、これがさらに、TCA回路の活性をア ロステリックに阻害することもわかってきた.この場合、 NADHオキシダーゼをコードしている*nox*遺伝子を組 み込んで発現させたり<sup>61)</sup>,ニコチン酸(NA)(好気条件) や硝酸(嫌気条件)を添加するとTCA回路がさらに活 性化することがわかってきた<sup>62,63)</sup>.

リンの代謝制御 次に,エネルギー源であるリンの

代謝制御機構も重要である.詳細は省略する<sup>64)</sup>が,内 膜に結合しているタンパク質PstSCABによって,リン 濃度が検知され,リン濃度が低下すると,この情報が PstSCABを経てPhoRに伝わり,PhoRが自己リン酸化 する.次に,PhoRがPhoBをリン酸化し,リン酸化さ れたPhoBはphoA,phoE,phoH,pstS,phoU,phoMなど, 31以上の遺伝子(Pho Box gene)の発現を調節制御す



図21. リンの代謝調節制御と他の遺伝子発現調節との関係

る<sup>64)</sup>. リンの濃度が高い場合は、PstSCABの情報が PhoUでブロックされてPhoRはリン酸化されない.また、 phoR/B遺伝子欠損株の遺伝子発現制御機構を調べてみ ると、リン酸化されたPhoBがなくても、酢酸合成経路 のアセチルリン酸(AceP)やPhoM(CreC)などが、 リン酸化の役割を担っていることがわかってきた.また、 図21に示すように、リンの遺伝子発現制御は、前述のC,N 制御の他に、次に述べる低pHでの発現制御とも関係し ていることがわかってきた<sup>65)</sup>.

pHの低下と遺伝子発現制御 pHの低下が細胞の 代謝に及ぼす影響は、実用上大変重要であるが、よく知 られているメカニズムは次のように考えられている. す なわち、細胞質のpHが低下する(プロトン濃度が上昇 する)と、培地中のグルタミン酸を取り込んで、gadAB によってコードされたグルタミン酸脱炭酸酵素の反応で プロトンを消費し、細胞質のpHを上げると同時に、 γ-aminobutyric acid (GABA) を生成し、これを、gadC によってコードされたグルタミン酸·GABA アンチポー タによって、細胞外に放出する<sup>60</sup>. 最近では、グルタミ ン酸だけでなく、アルギニンやリジンも同様のデカルボ キシラーゼを持っていることがわかってきた<sup>67)</sup>. また. このgadABCシステムによる耐酸性機構以外にも、図 22に示すように、H-NS、 cAMP-Crp、 RpoS、 OmpR、 EvgS/A, PhoQ/P, PhoR/Bなどの調節因子が絡んでいる ことがわかってきた (Marzan and Shimizu, in preparation). また, 興味深いことに, 細胞質のpHが低下し,



図22. pHの低下に伴う遺伝子発現制御ネットワーク

プロトン (H<sup>+</sup>) の濃度が増加するに従って, プロトンモー ティブフォース (PMF) が負から正に変化し, ATPase でATPを生成するのではなく, 逆にATPを使って, プ ロトンを ATPaseの逆反応で細胞の外に出す仕組みがあ ることもわかってきている <sup>68,69</sup>.

### システム生物学とモデリング

さて、システム生物工学の、究極の目標は、細胞の仕



図23. 代謝制御システム

組みをコンピュータ上に再現させる、いわゆるバーチャ ル細胞の構築だと思われる. このためには画期的なモデ ルの開発が必要になってくるが、上でも述べたように、 遺伝子レベルの代謝調節制御機構を明らかにしていくこ とと、そのシステムを組み込んだ代謝制御モデルの開発 が重要である.このような観点から、前述した、カタボ ライト制御を組み込んだモデルはいくつか提案されてい る<sup>70-72)</sup>が.他の培養環境の場合についても開発が進めば. 上記バーチャル細胞の実現にも期待が持てるようにな る. また, 精度良い<sup>13</sup>C-代謝フラックスの結果が得られ ると、ATP比生成速度やNAD(P)H比生成速度などを計 算でき、これらを比増殖速度などと比較してプロットし てみると、比例関係があることがわかる<sup>22,73)</sup>.この関係を 利用すれば、新しいATP生成(catabolism)やNADPH の生成(anabolism)を関数として組み込んだ細胞増殖 速度式が提案でき、これを用いれば、さまざまな遺伝子 欠損株の増殖予測もある程度できる<sup>72)</sup>.また、精度良い 代謝制御システムのモデルが利用できれば、代謝制御工 学(MCA) などの理論的アプローチも有効になってく ると思われる 74,75).

#### おわりに

以上,見てきたように、細胞をシステムとして理解す るためには、さまざまなレベルの情報を統合的に解析し (図23)、細胞システム制御の(ナイーブな)原理、ある いは生命原理といったものを見究めることが重要だと思 われる. 生物の種類によらず, 生命が生きているという ことは、生育環境から、常に栄養物を取り込み、エネル ギー生成や生合成を行う(非平衡プロセス)と同時に、 環境の変化に応じて、センサタンパク質がこれらを検知 し、調節タンパク質(あるいは転写活性因子)が代謝関 連遺伝子群の発現を調節制御して、細胞の代謝を動的に 機能させているということである<sup>70)</sup>. これらの制御シス テム全体を支配している生命原理といったものが存在し ているかどうかは定かではないが、生き残り戦略の歴史 の中で、分子進化のレベルで獲得したものだけでは説明 できないような気もする.いまもっとも興味を持ってい るところである.

なお、本研究を遂行するにあたって、研究室の学生、とり

わけよく頑張ってくれた博士課程(留)学生の諸君に感謝し たい.また,2000年から兼任している慶応義塾大学先端生命 科学研究所の冨田勝所長,板谷光泰教授や戸谷吉博博士を始 め、多くのスタッフに支えられてきており、感謝したい.さ らに、九州工業大学赴任時に、共同研究などで多くの意見交 換をさせていただいた,元九州大学の石崎文彬教授に感謝し たい.また,長い間,共同研究や意見交換をしている中国や 韓国の研究者にも感謝したい,さらに,科学技術振興機構(JST) の戦略的国際科学技術協力推進事業に関して、「バーチャル細 胞」の構築を試みているが、このプロジェクトに参画してく れている,英国サリー大学のJ.McFadden教授,マンチェスター 統合システム生物学センタのH.Westerhoff教授,および奈良 先端科学技術大学院大学の森浩偵教授を始めとする日英の研 究者に感謝したい.

# 文 献

- 1) 清水和幸:バイオプロセス解析法, コロナ社 (1997).
- 清水和幸:生命システム解析のための数学,コロナ社 (1999).
- Kabir, M., Pei, Yee, Ho., and Shimizu, K.: *Biochm. Eng. J.*, 26, 1–11 (2005).
- Zhu, J. and Shimizu, K.: Appl. Micobiol. Biotech., 64, 367–375 (2004).
- 5) Zhu, J. and Shimizu, K.: *Metabolic Eng.*, 7, 104–115 (2005).
- Marzam, L. W., Siddiquee, K. A. Z., and Shimizu, K.: *Bioeng. Bugs*, 2: 6, 1–7 (2011).
- Hua, Q., Yang, C., and Shimizu, K.: J. Biosci. Bioeng., 87, 206–213 (1999).
- Hua, Q., Araki, M., Koide, Y., and Shimizu, K., *Biotech. Prog.*, 17, 62–68 (2001).
- Covert, M. W., Schilling, C. H., Famili, I., Edwards, J. S., Goryanin, I. I., Selkov, E., Palsson, B. O.: *Trends Biochem. Sci.* 26 (3), 179–186 (2001).
- Yang, C., Hua. Q., and Shimizu, K.: J. Biosci. Bioeng. 93, 78–87 (2002).
- 11) Szyperski, T.: Eur. J. Biochem., 232, 433-448 (1995).
- 12) Marx, A., Graaf, A. A., Wiechert, W., Eggeling, L., and Sahm, H.: *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 111–129 (1996).
- 13) Hua, Q., Yang, C., Baba, T., Mori. H., and Shimiz, K.: *J. of Bacteriology*, **185**, 7053–7067 (2003).
- Fischer, E. and Sauer, U.: *Eur. J. Biochem.*, 270, 880– 891 (2003).
- Matsuoka, Y. and Shimizu, K.: *Biochem. Eng. J.*, 49, 326–336 (2010).
- Matsuoka, Y. and Shimizu, K.: Process Biochem., 45, 1873–1881 (2010).
- 17) Zupke, C. and Stephanopoulos, G.: *Biotechnology Progress*, **10**, 489–498 (1994).
- 18) Schmidt, K., Carlsen, M., Nielsen, J., and Villadsen, J.: *Biotech. Bioeng.*, 55, 831–840 (1997).
- 19) 清水和幸:細胞の代謝システムーシステム生命科学による統合的代謝制御システム,コロナ社 (2007).
- Zhao, J. and Shimizu, K.: J. Biotechnol., 101, 101–117 (2003).
- 21) Toya, Y., Ishii, N., Hirasawa, T., Naba, M., Hirai, K., Sugawara K., Igarashi, S., Shimizu, K., Tomita, M., and

Soga, T.: J. Chromatography, 1159, 134-141 (2007).

- Toya, Y., Ishii, N., Nakahigashi, K., Hirasawa, T., Soga, T., Tomita, M., and Shimizu, K.: *Biotech. Prog.*, 26, 975–992 (2010).
- 23) Wittmann, C. and Heinzle E.: *Biotechnol Bioeng.*, **62**(6), 739–750 (1999).
- 24) Wiechert, W., Siefke, C., Graaf, A. A., and Marx, A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 118–135 (1997).
- Mollney, M., Wiechert, W., Kownatzki, D., and Graaf, A. A. D.: *Biotech. Bioeng.*, 66, 86–103 (1999).
- Arauzo-Bravo, M. J. and Shimizu, K.: J. Biotechnol., 105, 117–133 (2003).
- 27) Yang, C., Hua, Q., and Shimizu, K.: Appl. Microbiol. Biotech., 58, 813–822 (2002).
- 28) Yang, C., Hua, Q., and Shimizu, K.: *Metabolic Eng.*, 4, 202–216 (2002).
- 29) Zhao, J., Baba, T., Mori, H., and Shimizu, K.: *Metabolic Eng.*, 6, 164–174 (2004).
- Zhao, J., Baba, T., Mori, H., and Shimizu, K.: *FEMS Microb. Lett.*, **220**, 295–301 (2004).
- 31) Kabir, M. and Shimizu, K.: J. Biotechnol., **105**, 11–31 (2003).
- Kabir, M. and Shimizu, K.: *Appl. Microbiol. Biotech.* 62, 244–255 (2004).
- 33) Siddiquee, K. A. Z., Arauzo-Bravo, M. and Shimizu, K.: Appl. Micobiol. Biotechnol., 63, 407–417 (2004).
- Siddiquee, K. A. Z., Arauzo-Bravo, M. and Shimizu, K.: FEMS Microbiol. Lett., 235, 25–33 (2004).
- 35) Kedar, R., Colah, R., and Shimizu, K.: *Enzyme and Microbiol. Technol.*, **41**, 455–465 (2007).
- 36) Yang, C., Hua, Q., Baba, T., Mori, H., and Shimizu, K.: *Biotech. Bioeng.*, 84, 129–144 (2003).
- Peng, L., Arauzo, M., and Shimizu, K.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 235, 17–23 (2004).
- 38) Li, M., Yao, S., and Shimizu, K.: J. Biotechnol., 122, 254–266 (2006).
- 39) Li, M., Ho, P. Y., Yao, S., and Shimizu, K.: Biochem. Eng. J., 30, 286–296 (2006).
- 40) Ishii, N., Nakahigashi, K., Baba, T., Robert, M., Soga, T., Kanai, A., Hirasawa, T., Naba, M., Hirai, K., Hoque, A., Ho, P. Y., Kakazu, Y., Sugawara, K., Igarashi, S., Harada, S., Masuda, T., Sugiyama, N., Togashi, T., M. Hasegawa, M., Takai, Y., Yugi, K., Arakawa, K., Iwata, N., Toya, Y., Nakayama, Y., Nishioka, T., Shimizu, K., Mori, H., and Tomita, M.: *Science*, **316**, 593–597 (2007).
- Peng, L. and Shimizu, K.: *Appl. Microbiol. Biotech.*, 61, 163–178 (2003).
- 42) Hua, Q., Chen, Y., Oshima, T., Mori, H., and Shimizu, K.: *Applied and Environ. Microbiol.*, **70**, 2354–2366 (2004).
- 43) Kabir, M. M. and Shimizu, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65**, 84–96 (2004).
- 44) Shimizu, K.: Biochem. Eng. J., 46, 235-251 (2009).
- Shimizu, K.: Advances in Biochemical Engineering / Biotechnol., vol. 91, p.1–49(2004).
- Matsuoka, Y. and Shimizu, K.: *Biotech. J.*, 6, 1330–1341 (2011).
- 47) Monod, J., Ann. Rev. Microbiol., 3, 371–394 (1949).
- 48) Gosset, G., Microbial. Cell Fact., 4, 14 (2005).
- 49) Yao, R., Hirose, Y., Sarkar, D., Nakahigashi, K., Ye, Q.,

and Shimizu, K.: Microbial Cell Factories, 10, 67 (2011).

- Deutscher J., Francke, C., and Postma, P. W.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 939–1031 (2006).
- 51) Gorke, B. and Stulke, J., *Nature Reviews, Microbiol.*, 6, 613–624 (2008).
- 52) Sarkar, D. and Shimizu, K.: *Biochem. Eng. J.*, **42**, 224–228 (2008).
- 53) Sarkar, D., Siddiquee, K. A. Z., Arauzo-Bravo, M. J., Oba, T., and Shimizu, K.: *Arch. Microbiol.*, **190**, 559– 571 (2008).
- Peng, L. and Shimizu, K.: *Enzyme Microbiol. Technol.*, 38, 512–520 (2006).
- 55) Rahman, M. and Shimizu, K., *Molecular Biosys.*, 4, 160–169 (2008).
- 56) Rahman, M., M. M. Hasan, Shimizu, K., *Biotechnol. Lett.*, **30**, 853–860 (2008)
- 57) Rahman, M., Hasan, M. R., Oba, T., and Shimizu, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **94**, 585–595 (2006).
- Aronis, H. R.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 373–395 (2002).
- 59) Kumar, R. and Shimizu, K.: *Microbial. Cell Factories*, 9, 8 (2010).
- 60) Kumar, R. and Shimizu, K., *Microbial. Cell Factories*, **10**, 3 (2011).
- 61) Vemuri, G. N., Eiteman M. A., and Altman, E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **90**, 64–76 (2005).
- Nizam, S. A. and Shimizu, K.: Biochem. Eng. J., 42, 229–236 (2008).
- 63) Nizam, S. A. and Shimizu, K.: *Biochem. Eng. J.*, 44, 240–250 (2009).
- 64) Wanner, B. L. In Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology. American Society for

*Microbiology, Washington DC* Edited by Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., and Umbrager, H. E., 1357–1381 (1996).

- Marzan, L. W. and Shimizu, K.: Microbial Cell Factories, 10, 39 (2011).
- 66) Jung, I. L. and Kim, I. G.: J. Biol. Chem., 278 (25), 22846–22852 (2003).
- 67) Richard, H. T. and Foster, J. W.: J. of Bacteriol., 86 (18), 6032–6041 (2004).
- 68) Stincone, A., Daudi, N., Rahman, A. S, Antczak, P., Henderson, I., Cole, J., Johnson, M. D., Lund, P., and Falciani, F.: *Nucl. Acids Res.*, **39** (17), 7512–7528 (2011).
- 69) Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., and Hearst, J. E.: *Mol. Microbiol.*, 16, 45–55 (1995).
- 70) Bettenbrock, K., Fischer, S., Kremling, A., Sauter, F. T., and Gilles, E. D.: *J. Biol. Chem.*, **281** (5), 2578–2584 (2006).
- 71) Usuda, Y., Nishio, Y., Iwatani, S., Van Dien, S. J., Imaizumi, A., Shimbo, K., Kageyama, N., Iwahata, D., Miyano, H., and Matsui, K.: *J. Biotechnol.*, **147**, 17–30 (2010).
- 72) Kotte, O., Zaugg, J. B., and Heinemann, M.: *Mol. Sys. Biol.*, doi: 10.1038/msb.2010.10 (2010).
- 73) Kadir, T. A., Mannan, A. A., Kierzek, A. M., McFadden, J., Shimizu, K.: *Microbial Cell Factories*, 9, 88 (2010).
- 74) Hua, Q., Yang, C., Shimizu, K.: J. Biosci. Bioeng., 87, 184–192 (2000).
- 75) Yang C., Hua, Q., and Shimizu, K.: J. Biosci. Bioeng., 88, 393–403 (1999).
- Shimizu, K.: Bacterial Cellular Metabolic Systems, Biohealthcare Publ.Co., Oxford (2012).